

氏 名	Md. Mushfequr Rahman
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	学 術
学位授与番号	博甲第3480号
学位授与の日付	平成19年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Molecular cloning and biochemical characterization of the multidrug efflux pumps in <i>Vibrio cholerae</i> non-O1 (<i>Vibrio cholerae</i> non-O1 の多剤排出ポンプの遺伝子クローニングと生化学的解析)
論文審査委員	教授 土屋 友房 教授 森山 芳則 教授 三好 伸一

学位論文内容の要旨

Antibiotic resistant strains of *Vibrio cholerae* have repeatedly caused epidemics cholera, and drug resistant strains became a serious threat to the treatment of cholera patients. Among the several drug resistance mechanisms, multidrug efflux pumps play the major role in drug resistance in bacteria. So far some multidrug efflux pumps have been reported both from toxigenic and non-toxigenic *V. cholerae*. In order to exploit effective antimicrobial compounds to fight against *V. cholerae* and protect human health, as the first step, it is urgent and essential to understand the drug efflux mechanisms (protein) and the biochemical characterization of these efflux proteins. Thus, we decided to analyze the multidrug efflux transporters encoded by the *V. cholerae* which may be potentially involved in antibiotic extrusion.

Through the isolation and characterization, I found three putative multidrug efflux transporters, namely VexAB, VexCD and VexEF from *V. cholerae* non-O1 NCTC 4716. All of them are the member of RND family, are capable of conferring increased MIC for the structurally and functionally unrelated compounds such as erythromycin, novobiocin, rhodamine 6G, TPPCl, cholates and so on. We previously reported Na⁺-dependent substrate efflux MATE family transporters from Vibrios. Interestingly, here I found one of the RND efflux pump, VexEF is a Na⁺-dependent efflux transporter. This is the first case of Na⁺-dependency in the RND-type efflux transporters.

The role of bacterial MFS transporters in conferring drug resistance has been described from many bacteria. In *V. cholerae*, almost 40% of the putative multidrug efflux transporters belong to MFS family. Although there are some multidrug transporter have been reported from *V. cholerae* but so far only one multidrug efflux transporter of MFS family has characterized in *V. cholerae*. Out of eleven, I could succeed to clone six MFS genes from *V. cholerae* non-O1 and tried to characterize them in *E. coli* but did not get any drug resistance activity. There might have some reason for that. Therefore, further studies are needed for these putative pump genes.

Despite extensive research for many years, the actual mechanism of multidrug transport is still largely unknown. Further, the existence of antibiotic efflux pumps and their impact on therapy must now be taken fully into account for the selection of novel antimicrobials. The design of specific, potent inhibitors appears to be an important goal for the improved control of infectious diseases in the near future.

論文審査結果の要旨

Vibrio cholerae は下痢症の原因菌である。本論文では病原性のない *V. cholerae* non-O1 株を用いて、各種抗菌薬に対する耐性（多剤耐性）に関与する多剤排出ポンプの解析を行っている。ゲノム情報から、この菌には複数の多剤排出ポンプ遺伝子が存在すると予想された。それらポンプの中で最も基質特異性が広く活性が強いと考えられた RND 型の排出ポンプについて遺伝子クローニングと性質の解析を行っている。まず、PCR 法により、全ての RND 型多剤排出ポンプ遺伝子（6 個）をクローニングし、それらを *vexAB*, *vexCD*, *vexEF*, *vexGH*, *vexIJK*, *vexLK* と命名した。宿主大腸菌でそれらを発現させ、抗菌薬に対する耐性度の上昇を調べている。また、外膜成分 TolC の要求性についても解析している。さらに *V. cholerae* non-O1 本来の外膜成分についても遺伝子をクローニングし、機能解析を行っている。さらに *vexAB*, *vexCD*, *vexEF*, *vexGH*, *vexIJK*, *vexLK* の *V. cholerae* non-O1 細胞での発現も調べている。実際にこれら遺伝子の発現が確認されたことから、これらの多剤排出ポンプは実際にこの菌の多剤耐性に関わっているものと思われた。

以上のように、この論文は *V. cholerae* non-O1 の多剤耐性に関わる RND 型多剤排出ポンプの 6 個の遺伝子クローニングと性質の解析を行った大変興味深いものであり、博士（学術）の学位に値するものと判断した。